

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Шляхтунова Евгения Александровича «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение»**, представленную на соискание ученой степени доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология».

*Соответствие диссертации специальностям и отрасли науки, по которым она представлена к защите.* Диссертационная работа Е.А. Шляхтунова по содержанию, поставленной цели, задачам, использованным материалам и методам, научной новизне и практической значимости соответствует специальности 14.01.12 – онкология, отрасли – медицинские науки.

*Актуальность темы диссертации.* Рак молочной железы (РМЖ) является одной из наиболее распространенных форм онкологической патологии, занимает первое место среди злокачественных новообразований у женщин. В то же время он является наиболее изучаемым онкологическим заболеванием, но многие вопросы этиологии, генеза, диагностики и лечения все еще слабо разработаны. РМЖ – многофакторное заболевание. Факторами риска являются возраст, наследственность, включая значимые мутации в генах BRCA1, BRCA2, генах ATM, TP53 и PTEN, гинекологический анамнез, пероральные контрацептивы, гормональная и лучевая терапия, а также характер питания и образ жизни пациенток.

В последние годы в диагностике РМЖ все шире используется молекулярно-генетическое типирование опухолевых клеток, позволяющее выделить в рамках одного заболевания несколько характерных молекулярно-клеточных подтипов. Важнейшей и нерешенной проблемой болезни является метастазирование и минимальная остаточная болезнь (МОБ). Метастатический процесс сложен, многокомпонентен, включает ряд этапов - миграцию клеток из первичной опухоли, выживание в периферической крови в форме циркулирующих опухолевых клеток (ЦОК) или в форме диссеминированных опухолевых клеток (ДОК) в костном мозге. В представленной к защите диссертационной работе данным вопросам уделяется большое внимание. Таким образом, докторская диссертация Е.А. Шляхтунова «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение» посвящена решению актуальной проблемы здравоохранения и медицинской науки.

*Степень новизны результатов, полученных в диссертации, и*

*научных положений, выносимых на защиту.* Выносимые на защиту положения диссертации сформулированы на основе впервые полученных автором результатов, характеризующихся высокой научной новизной. Результаты исследований подкреплены глубоким статистическим анализом. На основании полученных результатов на защиту вынесено 6 основных положений. Положение 1 отражает совершенствование методов молекулярной диагностики РМЖ посредством собственных разработок тест-систем детекции транскриптов генов BIRC5, HER-2/neu и c-ABL методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени с высокой аналитической чувствительностью и специфичностью. Положение 2 посвящено молекулярно-генетической характеристике циркулирующих опухолевых клеток у пациентов I–IIIС рака, включая их полиморфизм и использование информации о профиле экспрессии генов для прогноза возврата болезни. Положение 3 подводит итоги результатов молекулярно-генетического анализа экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu в ЦОК, обосновывает их определение этим методом на всех этапах лечения. Положение 4 обосновывает изменение транскрипционного фенотипа ЦОК в результате 4-х курсовой адъювантной химиотерапии и снижение частоты обнаружения ЦОК, экспрессирующих гены BIRC5 и HER-2/neu. Положение 5 свидетельствует о наличии связи между ЦОК, экспрессирующих гены BIRC5 и HER-2/neu, у пациентов с РМЖ I–IIIС стадии с неблагоприятным исходом болезни и использование оценки указанных генов в целях прогноза, а также коррекции адъювантной терапии, улучшения показателей выживаемости. Положение 6 указывает на возможность использования результатов экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu ЦОК в оценке эффективности адъювантной цитостатической химиотерапии, включающей ранний переход с антрациклинсодержащих схем при их неэффективности после 2-х курсов на таксаны с последующим переходом на гемцитабин. Этот подход позволяет добиться эрадикации ЦОК и значимо увеличить скорректированную пятилетнюю выживаемость на 11,6%, а безрецидивную пятилетнюю выживаемость на 7,4% по сравнению со стандартными режимами

*Обоснованность и достоверность выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации.* Для достижения поставленной цели Е.А. Шляхтуновым использован большой объем клинического материала, представленный результатами обследования и лечения 230 пациенток с первичным резектабельным РМЖ I–IIIС стадии и 52-х женщин контрольной группы (32 с доброкачественной патологией молочных желез и 20 здоровых). Использовано двухэтапное клиническое исследование включающее: а)

проспективное сплошное нерандомизированное исследование в группе 162 пациенток, получавших стандартное лечение в 2015-2016гг; б) проспективное контролируемое исследование по принципу адаптивной рандомизации в группе 68 женщин, получавших лечение с учетом разработанного метода терапии в 2016-2017гг. В работе использован широкий спектр современных высокоинформативных молекулярно-генетических, иммуногистохимических и клинических методов исследования. Семь пунктов заключения основанных на полученных научных результатах соответствуют цели и задачам исследования, а также положениям, выносимым на защиту. Рекомендации по практическому использованию результатов изложены в инструкциях утвержденных министерством здравоохранения Республики Беларусь, которые подтверждены актами внедрения. Анализ полученных данных в ходе исследования осуществлен с применением современных методов биологической статистики (Статистика 20.0).

**Глава 1 «Аналитический обзор литературы.** В обзоре на современном уровне рассматриваются эпидемиология, клеточно-молекулярные механизмы канцерогенеза, метастазирование, определение и клиническое значение ЦОК, ДОК и МОБ при РМЖ. Значительное внимание уделено роли локальных механизмов рецидива заболевания, лекарственной резистентности, включая панрезистентность, эпителиально-мезенхимальному и мезенхимально-эпителиальному переходам, МОБ, а также современным подходам к ее лечению. Данная глава снабжена результатами мета-анализа по проблеме, что усиливает ее научно-аналитический уровень. Показано, что в 15 работах опухолевые клетки определяли на основании только одного гена, а в остальных 9-ти работах использовали определение более 2-х генов. Представленные в обзоре данные свидетельствуют об интенсивном внедрении молекулярно-генетических методов в диагностику РМЖ, а также о недостаточности изученности проблемы и необходимости проведения углубленных исследований. Следует отметить, что обзор страдает недостаточным анализом работ отечественных авторов по проблеме и русскоязычной литературы в целом.

**Глава 2 посвящена объектам, материалам и методам исследования.** В данной главе приведены сведения о пациентах, принимавших участие в исследовании, а также общий дизайн исследования, клиническая характеристика пациентов, описание методов и технологии лечения, а также методов лабораторных исследований ЦОК, иммуногистохимической и ОТ-ПЦР оценки экспрессии сурвивина, статистические методы.

**Глава 3 «Разработка и клиническая оценка тест-систем для определения транскриптов генов и идентификации циркулирующих опухолевых клеток при раке молочной железы».** В данной главе приведено описание подходов и технологии разработки молекулярно-генетических тест-систем диагностики РМЖ на основе ОТ-ПЦР для детекции транскриптов генов BIRC5, HER2 и c-ABL и др. генов. В разделе 3.1 описывается разработка тест-системы для выявления транскриптов генов BIRC5, HER2 и c-ABL. Автор последовательно излагает этапы разработки праймеров и зондов, оптимизацию постановки ПЦР, и возможности использования для количественной оценки. Далее в разделе 3.2 анализируются результаты клинической апробации тест-системы по оценке экспрессии гена сурвивина BIRC5 и рецептора фактора эпидермального роста HER-2/neu в ткани карциномы молочной железы. Во всех 67 образцах первичной инвазивной неспецифицируемой (протоковой) карциномы молочной железы искомые гены экспрессировались с разным уровнем. Результаты оценки экспрессии гена HER-2/neu методом ПЦР слабо коррелировали с таковыми при использовании иммуногистохимического метода. В разделе 3.3 приводится сравнительный анализ технологий обогащения (на основе анти-CD326/EpCAM и анти- MUC- 1 b GA733-2/EpCAM) и выделения ЦОК при неметастическом РМЖ и их молекулярно-генетическая характеристика. Тест-системы зарегистрированы в Республике Беларусь. Автором доказано, что технология экспресс-выделения ЦОК на основе ковалентно-связанных антител CD326(EpCAM) на немагнитную матрицу крупных микросфер с последующей изоляцией ЦОК по экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu позволяет статистически значимо в 2,5 раза чаще выявлять ЦОК в парных образцах периферической крови, по сравнению с коммерчески доступной технологией их иммуномагнитного обогащения.

**Глава 4 «Транскрипционный фенотип циркулирующих опухолевых клеток при первичном неметастическом раке молочной железы».** При исследовании периферической крови пациентов с верифицированным первичным неметастическим РМЖ экспрессия гена c-Abl и хотя бы одного маркерного гена в ЦОК была выявлена у 69 женщин из 102 обследованных(67,6%). Экспрессия гена рецептора эпидермального фактора роста HER-2/neu в ЦОК определялась у 64 из 69 ЦОК-позитивных пациентов (92,8%). Экспрессия гена антиапоптотического протеина сурвивина BIRC5 идентифицировалась у 49 из 69 ЦОК-позитивных пациентов (71%). Следует отметить, что статистически значимой зависимости частоты выявления целевых ЦОК от стадии опухолевого

процесса, морфологических и молекулярно-биологических характеристик опухоли не было получено. Группа из 51 женщины из 69 ЦОК-положительных пациенток (74%) была положительной, по меньшей мере, для одного из маркеров эпителиально-мезенхимального перехода, а 32 из 69 пациенток (46,4%) являлись положительными для ALDH1 соответственно. Установлены значимые различия в большей частоте идентификации ЦОК по таргетным генам эпителиально-мезенхимального перехода при сверхэкспрессирующем онкопротеин HER-2/neu раках – люминальный B HER2+ и гиперэкспрессирующий HER2 ( $p=0,001$ ).

ЦОК, экспрессирующие ген стволовой опухолевой клетки ALDH1, выявлялись только у пациентов с наличием метастазов в регионарные лимфатические узлы (N+), а соответственно в «продвинутых» стадиях опухолевого процесса (IIВ–IIIС) со статистически значимым уровнем  $p=0,001$ . В 59 образцах из 69 ЦОК-положительных проб (86%) определялась экспрессия как минимум одного целевого гена лекарственной устойчивости. Экспрессия четырех генов была обнаружена у 17 пациентов (25%), трех генов – у 20 женщин (29%), два и один ген экспрессировались у 10 и 12 человек соответственно (14% и 17%). Ген ABCG2 идентифицировался в 56% образцов. С одинаковой частотой (54%) экспрессировались гены ABCC1 и ABCC10. Частота экспрессии генов ABCB1 и ABCC5 составила 35% и 21% соответственно. Статистически значимой зависимости частоты экспрессии генов семейства ABC-транспортёров от морфологических и молекулярно-биологических характеристик первичной опухоли не выявлено.

**Глава 5 «Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены BIRC5 и HER-2/neu, как маркеров минимальной остаточной болезни при хирургическом лечении рака молочной железы».** Таргетные ЦОК до оперативного вмешательства выявлены у 115 пациенток из 162(71%). После операции ЦОК, экспрессирующие гены BIRC5 и HER-2/neu, исчезли у 40,9% пациенток, а у 51,3% сохранялись. У 9 пациентов они стали выявляться в обогащенных образцах венозной крови. После радикальной мастэктомии частота сохранения ЦОК была ниже, чем при радикальной резекции молочной железы.

**В главе 6 «Клиническое значение циркулирующих опухолевых клеток, экспрессирующих гены BIRC5 и HER-2/neu, как маркеров минимальной остаточной болезни при адьювантном лечении рака молочной железы»** приведен анализ эффективности адьювантного лечения в отношении эрадикации ЦОК. Схема адьювантной полихимиотерапии в

режиме САФ (CEF) и МОБ была применена у 41 пациента. Сочетание радикальной резекции с АПХТ по данной схеме снижало частоту выявления мРНК генов BIRC5 и HER-2/neu положительных ЦОК с 37 до 23 случаев (на 26Ю9%), но она не привела к снижению частоты выявления таргетных ЦОК. Частота выявления недостоверно повышалась после 6 курсов химиотерапии( $p>0/05$ ). При проведении АПХТ экспрессия таргетных генов в ЦОК экспрессия гена BIRC5 в ЦОК увеличивалась после 6 курсов САФ(CEF) относительно уровня нормализованной экспрессии этого гена после 2-х курсов. Сочетание радикальной операции и применением схемы АПХТ рака молочной железы в режиме АС(ТС) при МОБ применено у 40 пациентов (24,7%) и позволило снизить частоту выявления мРНК BIRC5 и HER-2/neu положительных ЦОК в крови пациенток на 26,7%. Частота выявления ЦОК после 2 курсов терапии была выше, чем в послеоперационном периоде и снижалась после 4-х курсов. ЦОК экспрессирующие BIRC5 и HER-2/neu полностью исчезали у 6(15%), а сохранялись у 12(30%). У 17(42,5%) пациенток мРНК этих генов либо исчезала, либо выявлялась.

Схема АПХТ в режиме доксорубин+ циклофосфан+ паклитаксел (АС-Т) при лечении МОБ рака молочной железы выполнена 25(15,4%) пациентам и приводила к снижению выявления мРНК BIRC5 и HER-2/neu положительных ЦОК на 68%(с 21 случая до 4-х случаев) после 8 курсов. Схема ПХТ АС-Т была эффективной у 84,4% пациенток и неэффективной у 16%. Адьювантная терапия по схеме сочетания таксанов(паклитаксел) с трастузумабом (Т-Траст) составила 75%(у 15 из 20 пациенток). Опухолевые клетки исчезли только у 8 из 13 женщин (61,54%). Лучевая терапия у 21 пациентки приводила к снижению частоты выявления ЦОК экспрессирующих гены BIRC5 и HER-2/neu на 52,4% от исходного уровня и исходного уровня после операции на 33,4%. ЛТ после ПХТ не позволяет осуществлять контроль над МОБ. Гормональная терапия приводила к снижению частоты выявления мРНК BIRC5 и HER-2/neu положительных ЦОК с 22 случаев до 15(25%).

Анализ эффективности АЛТ после оперативного лечения показал, что последовательное назначение антрациклинов и таксанов(паклитаксела) АС-Т позволяет снизить частоту МОБ в сравнении с другими схемами с 68,5 до 15%. У 115(70,9%) пациенток РМЖ до начала терапии определялась ранняя диссеминация ЦОК. Хирургическое лечение снижало частоту выявления МОБ до 41,9%, а дополнительная адьювантная терапия – до 40,7%.

**Глава 7 «Прогностическое значение циркулирующих опухолевых клеток в отношении выживаемости пациенток, страдающих раком**

**молочной железы».** В данной главе представлены результаты скорректированной и безрецидивной выживаемости пациентов сплошного проспективного нерандомизированного исследования. Так, к концу пяти лет наблюдения прогрессирование заболевания было диагностировано у 40 женщин из 162, из них умерло 28. Скорректированная 5-летняя выживаемость группы проспективного исследования достигла  $82,7 \pm 2,9\%$ . Безрецидивная 5-летняя выживаемость указанной категории пациенток составила  $80,6 \pm 3,3\%$ .

В результате многофакторного анализа установлено, что независимое влияние на безрецидивную выживаемость пациентов, страдающих РМЖ, оказывают следующие факторы: а) наличие в периферической крови ЦОК до начала специального лечения, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки ALDH1; б) стадия опухолевого процесса (с поражением или без регионарных лимфатических узлов); в) индексе пролиферативной активности первичной карциномы Ki 67; г) сохранение ЦОК (МОБ) после завершения противоопухолевой терапии. Неблагоприятными факторами риска прогрессирования и возврата болезни являются стадия опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+), которая увеличивает риск прогрессирования в 3,8 раза, Ki 67 >20%, увеличивающий риск в 2,7 раза, наличие ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки ALDH1 до начала специального лечения, увеличивающих риск в 1,2 раза, и сохранение ЦОК (МОБ) после завершенного противоопухолевого лечения увеличивает риск рецидива болезни в 3,6 раза. У пациенток, имеющих все четыре неблагоприятных фактора, условная вероятность смерти в 44,3 раза выше, чем у пациенток с их отсутствием.

**Глава 8 «Адьювантная ЦОК-ориентированная терапия пациентов с неметастатическим раком молочной железы».** В данной главе приводятся данные анализа результатов клинической апробации предложенной автором методики оценки эффективности химиотерапии и метода лечения МОБ. Анализ периферической крови 68 пациентов выявил наличие ЦОК у 43 пациенток (63,2%) по экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu. Применение метода лечения МОБ, основанного на своевременном переходе с неэффективной схемы адьювантной ПХТ на таксаны не дожидаясь завершения запланированных курсов, а также при необходимости дополнительного проведения монокимиотерапия гемцитабином демонстрирует высокий уровень радикации мРНК генов BIRC5 и HER-2/neu положительных ЦОК. В свою очередь это указывает на возможность статистически значимо увеличить скорректированную 5-летнюю

выживаемость на 11,6%, а безрецидивную 5-летнюю выживаемость на 7,4,6% с экономической эффективностью 11,82.

**Научная, практическая, экономическая и социальная значимость результатов диссертации с указанием рекомендаций по их использованию.** Научная значимость результатов диссертации Е.А. Шляхтунова заключается в разработке новых направлений подходов диагностики и терапии РМЖ. Им обоснована новая концепция мониторинга ЦОК, включающая молекулярное типирование опухолевых клеток и динамическое наблюдение в процессе стандартной и предложенной автором схемы адьювантной химиотерапии. Практическая, экономическая и социальная значимость обусловлена высокой распространенностью РМЖ среди женщин в мире, Республике Беларусь и снижением экономических потерь вследствие повышения эффективности диагностики и терапии пациентов.

На основании полученных данных о патогенезе РМЖ и минимальной остаточной болезни разработаны, апробированы и внедрены в практику методы молекулярно-генетической диагностики на основе ОТ-ПЦР. Утверждены Министерством здравоохранения две инструкции по применению – «Метод оценки эффективности химиотерапии путем определения экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu в ЦОК», №007-0217 и «Метод адьювантной цитостатической терапии МОБ у пациентов, страдающих раком молочной железы», №045-0518. В 2016г. в Республике Беларусь зарегистрированы 3 тест-системы, получено два патента. Экономическая эффективность оптимизации адьювантной терапии РМЖ с учетом предотвращенного экономического ущерба составила 11,82, т.е. 1 затраченный на лечение доллар США приносит экономию около 12\$.

**Полнота опубликования основных положений диссертации.** Все научные положения и выводы по результатам диссертации изложены в 47 научных работах: 2-х монографиях, 15 журнальных статьях соответствующих требованиям ВАК Республики Беларусь, 7 статьях в зарубежных профильных журналах, 19 статей опубликованных в сборниках научно-практических конференций. Единолично опубликованы 22 научные работы, что свидетельствует о персональном вкладе диссертанта в развитие данного нового направления. Результаты диссертационной работы были многократно представлены и обсуждены на республиканских и международных научных и научно-практических профильных конференциях и конгрессах в период с 2015 по 2021 год. Автореферат соответствует



содержанию диссертационной работы, а его оформление требованиям инструкции ВАК.

*Оценка оформления работы.* Оформление диссертации хорошее соответствует требованиям ВАК Республики Беларусь. Работа изложена на 304 страницах, включает перечень сокращений, введение, общую характеристику работы, обзор литературы (46 стр.), описание материалов и методов (24 стр.), 8 глав собственных исследований (133 стр.), заключение (4 стр.), библиографический список источников (429 ист.), собственных публикаций (37 стр.), приложения (42 стр.). Диссертация содержит 95 таблиц и 57 рисунков. Приложение включает регистрационные удостоверения – 3, технические условия на тест-системы – 3, отчеты о проведении клинических испытаний – 6, инструкции по применению – 2 и акты внедрения – 20, патенты на изобретения – 2.

*Соответствие научной квалификации соискателя ученой степени, на которую он претендует.* Знание современной литературы, опыт научно-педагогической работы, разработка методов исследований, глубокий анализ и новые научные достижения подтверждают, что научная квалификация Е.А. Шляхтунова соответствует ученой степени доктора медицинских наук.

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ.** Диссертация Евгения Александровича Шляхтунова «Минимальная остаточная болезнь при раке молочной железы – диагностика и лечение» по специальности 14.01.12 – «онкология» является завершенной, самостоятельно выполненной квалификационной научной работой, посвященной решению актуальной научной проблемы в области онкологии – разработке методов диагностики и лечения РМЖ, соответствует требованиям пункта 20 «Положения о присуждении ученых степеней Республики Беларусь», предъявляемым к докторским диссертациям.

Соискателю может быть присуждена ученая степень доктора медицинских наук по специальности 14.01.12 – «онкология» за:

– научное обоснование, разработку, производство и внедрение в практику чувствительных и специфичных отечественных молекулярно-генетических тест-систем для выявления и оценки экспрессии генов, ассоциированных с раком молочной железы BIRC5, HER-2/neu и cABL;

– установление закономерностей экспрессии генов BIRC5 и HER-2/neu тканью карциномы молочной железы, взаимосвязей между экспрессией генов и их белковыми продуктами, использование методики оценки экспрессии данных генов для идентификации ЦОК – маркеров минимальной остаточной болезни, а также в качестве маркеров ответа на терапию;

– оценку частоты выявления ЦОК у пациентов РМЖ I–III стадии у (67,6%) пациентов, обоснование гетерогенности транскрипционного профиля ЦОК, установление ассоциации маркеров эпителиально-мезенхимального перехода и маркеров стволовой опухолевой клетки, а также генов лекарственной устойчивости;

– научное обоснование прогностической модели возврата болезни у пациентов, страдающих РМЖ, включающей стадию опухолевого процесса с поражением регионарных лимфатических узлов IIВ–IIIС (N+), которая увеличивает риск прогрессирования в 3,8 раза, Ki 67 >20%, увеличивающий риск в 2,7 раза, наличие ЦОК, экспрессирующих ген стволовой опухолевой клетки ALDH1 до начала специального лечения, увеличивающее риск в 1,2 раза, и сохранение ЦОК (МОБ) после завершённого противоопухолевого лечения, что увеличивает риск рецидива болезни в 3,6 раза, суммарно увеличивающие условную вероятность смерти в 44,3 раза выше, чем у пациентов, у которых эти факторы отсутствуют;

– доказательства снижения частоты определения ЦОК, экспрессирующих гены BIRC5 и HER2, в результате АПХТ по схеме AC-T и снижение МОБ с 68% до 16%, а также к радикации ЦОК у 15% пациентов при применении трастузумаба;

– обоснование использования метода лечения МОБ, основанного на смене неэффективной схемы АПХТ на таксаны и при необходимости на гемцитабин при максимальной радикации мРНК BIRC5 и HER2 положительных ЦОК, позволяющего повысить пятилетнюю скорректированную выживаемость на 11,6% до 90,3%, а безрецидивную выживаемость на 7,4% до 88,0% с экономической эффективностью 11,82.

Официальный оппонент:

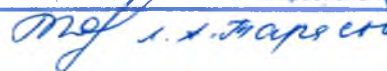
д.м.н., профессор, академик. НАН Беларуси,  
академик РАН, заведующий лабораторией  
клинической и экспериментальной микробиологии  
ГУ «Республиканский научно-практический  
центр эпидемиологии и микробиологии»

« 15 » сентябре 2022 г.

 И.П. Титов

Подпись удостоверяю

**ПОДПИСЬ УДОСТОВЕРЯЮ**  
Вед. специалист по кадрам  
РНПЦ эпидемиологии и микробиологии





28.09.2022. Получен отрыв оригинального доку-  
мента о. м. и, проф., академико. НАКБ Тимкова Л.Т.  
Ученый секретарь *С.И.* - К.А. Артемова

28.09.2022. С отзовом окончанием  
*И.И. Шварцман* Е.А.

УДОВОЛЕНИЕ  
ПОДПИСА УДОСТОВЕРЯЮЩАЯ  
ПОДПИСА УДОСТОВЕРЯЮЩАЯ  
ПОДПИСА УДОСТОВЕРЯЮЩАЯ